

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18440

研究課題名(和文) 肺扁平上皮癌におけるFGFR1の役割とFGFR阻害薬への耐性化を来す機序の解明

研究課題名(英文) FGFR1 as a molecular target of squamous cell lung cancer and the mechanism of FGFR inhibitor-resistance

研究代表者

天野 陽介 (Amano, Yosuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50749330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年肺癌に対する分子標的治療が注目および進歩しており、一方で同治療中の耐性化も大きな問題となっている。肺扁平上皮癌の治療標的として近年FGFR遺伝子が注目されており、同遺伝子に対する分子標的治療の耐性化機序についての検討を行った。本研究室でFGFR阻害薬AZD4547高感受性の肺扁平上皮癌細胞株を同定し、本研究室で低濃度より薬剤曝露させることで耐性株を樹立した。解析の結果、耐性株において高発現している遺伝子の中に肺癌の形質を変えうる転写因子を同定した。同遺伝子に対してsiRNAで阻害すると耐性株において有意な増殖抑制効果を認め、耐性化に関わる責任遺伝子および機序のひとつと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Molecular-targeted therapy has progressed in lung cancer in recent years, and acquired resistance during molecular-targeted therapy has become a major problem. In squamous cell lung cancer, FGFR has been identified as one of the molecular target and clinical trials of FGFR inhibitor are currently in progress. In this project, we analyzed the mechanism of acquired FGFR-inhibitor resistance.

We previously identified a squamous cell lung cancer cell line which is highly sensitive to FGFR inhibitor AZD4547, and established its resistance clone by exposing gradually-increasing concentration of AZD4547. Gene analysis identified a transcription factor that is expressed more in the resistance clone and is related to the change in the characteristics of cancer. Inhibition of this gene by siRNA induced growth inhibition of resistance clone. Therefore, this gene is one of the responsible genes for the resistance to FGFR targeted therapy.

研究分野：肺癌

キーワード：肺扁平上皮癌 分子標的治療 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本において最も死亡数の多い悪性腫瘍である。また IV 期肺癌においては全生存期間約 1 年と予後不良であり、従来の治療であるいわゆる殺細胞性抗がん剤は 1 次治療においても奏効率 3-4 割で生存期間の延長も軽度であった。しかし近年一部のがんにおいては単独の遺伝子異常のみでがん化に至るような重要な遺伝子 (oncogenic “driver”) が存在し、その遺伝子異常を有するがんにおいてその遺伝子を標的とする治療 (分子標的治療) が高い効果を来すことが示された。肺腺癌に対する EGFR や ALK 遺伝子はその代表であり、これらの遺伝子異常を有する肺腺癌においては、EGFR 阻害薬や ALK 阻害薬は 7 割以上の高い奏効率を示し、すでに保険収載されている。

肺扁平上皮癌においては分子標的治療の標的の解明が遅れているが、2010 年に Weiss らが (Weiss J, et al. *Sci Transl Med* 2010) FGFR1 の増幅が扁平上皮癌症例の 9.7% と高頻度で認め、FGFR1 増幅を有する細胞株で FGFR チロシンキナーゼ阻害薬が腫瘍縮小効果を認めたことを初めて報告した。それ以来報告が相次ぎ、FGFR1 に対する分子標的治療薬に対する臨床試験も行われている。

一方で分子標的治療薬は標的が狭いこともあり、結合部位の新たな変異やバイパス経路の活性化などにより耐性化を来すことが近年問題となっている。ただし、解明が進むことで治療ストラテジーに活かせる可能性があり、例えば EGFR チロシンキナーゼ阻害薬使用中に生じた耐性の約 4 割で新たに出現する EGFR T790M 変異に対しては、同部位に非可逆的に結合する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 Osimertinib が耐性後において約 7 割の奏効率を認め (Goss G, et al. *Lancet Oncol* 2016) すでに保険収載されている。

以上より、肺扁平上皮癌における分子標的治療およびその治療薬耐性機序についての研究が今後の肺癌診療において重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者はすでに FGFR1 チロシンキナーゼ阻害薬 AZD4547 を種々の肺癌細胞株に投与し感受性を確認しており、高感受性肺扁平上皮癌細胞株を同定した。併せて同細胞株に AZD4547 を低濃度より曝露することにより AZD4547 耐性の細胞株を樹立することに成功した。そこで、同耐性株を用いて FGFR1 阻害薬の治療中に生じる耐性機序を検討することとした。

## 3. 研究の方法

(1) FGFR1 耐性株の遺伝子発現プロファイルの確認として、microarray や RNA sequence

による解析を行うことで、耐性化に伴い発現量が変化した遺伝子や新規に生じた遺伝子変異を同定する。

(2) 耐性化に関わるシグナルパスウェイを検討するため、通常 FGFR シグナルパスウェイの下流として一般に知られている STAT3 経路、MAPK 経路および PI3K/AKT 経路の変化を Western blotting により確認し、またそれらが AZD4547 投与に伴い変化を来すかも併せて検討した。

(3) 上記を元に、耐性化の責任遺伝子・機序を同定するため、新たに発現亢進した遺伝子やシグナルパスウェイに対して既存の阻害薬や siRNA を用いて阻害することで、AZD4547 に対する感受性の改善や増殖能の変化を確認する。

## 4. 研究成果

まず、上記のとおり、同定した FGFR1 阻害薬 AZD4547 に高感受性細胞株に対して、AZD4547 を低濃度より曝露することで耐性株を樹立した。これらはショートタンデムリピート解析により、他の細胞株の混入がないことを確認した。また塩基配列解析により FGFR1-3 の遺伝子変異が生じていないことも確認した。

(1) もとの細胞株と耐性株とを microarray および RNA sequence において比較を行った。RNA sequence において、耐性株において新規に生じた遺伝子変異で耐性化に関与する可能性が高い遺伝子は同定出来なかった。microarray では false discovery rate (FDR) < 0.05 をカットオフとして有意に発現亢進・低下していた遺伝子はそれぞれ約 3% 見られた。そのうちの各々上位 50 遺伝子のうち、文献検索等がんと関連が報告されている遺伝子を中心に以降の検索を進めた。なお、RNA sequence を用いて発現解析を行ったが、microarray の発現データと比較的矛盾のない結果が得られていた。

(2) 既知の FGFR シグナルパスウェイの検索として、STAT3 経路、MAPK 経路、PI3K/AKT 経路のリン酸化を確認した。STAT3 経路は耐性株でリン酸化が亢進していたが、もとの細胞株・耐性株ともに AZD4547 によるリン酸化の抑制が見られなかった。MAPK 経路については耐性株でリン酸化が亢進していたが、もとの細胞株、耐性株とも AZD4547 によりリン酸化が抑制された。PI3K/AKT 経路については耐性株でリン酸化が低下していた。また FGFR1 自体の発現が抑制されていた。以上からは、FGFR 阻害薬は下流への効果は維持されているようだった。

(3) (2) では下流経路への阻害薬の効果は維持されているように見えたが、EGFR 遺伝子異

常に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬治療中にバイパス経路として HGF/MET 経路が活性化することで耐性化を来す (Engelman et al. *Science* 2007, Yano et al. *Cancer Res* 2008) という報告をはじめとし、バイパス経路の存在による耐性化があることを考慮して、MAPK や PI3K/AKT 経路の阻害薬や他の受容体型チロシンキナーゼ阻害薬による AZD4547 との併用効果を検討した。具体的には AZD4547 固定濃度に対して、他の阻害薬の希釈濃度系列を曝露させて、AZD4547 の有無による 50%増殖阻止濃度の変化を確認、またはその逆を行った。しかし、これらの阻害薬併用による AZD4547 の感受性の改善はあっても軽度であり、耐性機序に関わるほどのデータは得られなかった。

一方で(1)における発現亢進遺伝子の中で肺癌の形質に関わると考えられる転写因子を同定し、その遺伝子に対する siRNA を作成し、レンチウイルスで耐性株にトランスフェクションしたところ、コントロールと比べて AZD4547 の感受性が改善するわけではなかったが、siRNA による同遺伝子の阻害単独で、もとの細胞株は増殖抑制を来さない一方で、耐性株においてのみ有意な細胞増殖抑制を認めた。したがって、同転写因子が耐性化に関わる責任遺伝子のひとつと考えられた。

現在、その遺伝子が引き起こす耐性化機序についての追加実験および論文投稿準備中である。今回発見した機序は FGFR 阻害薬以外の分子標的治療においても共通して耐性化に関わる可能性があり、引き続き検討を進めていく。

#### <引用文献>

Weiss J1, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med.* 2010;2:62ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3001451.

Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, Bazhenova L, Lee JS, Chang GC, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016;17:1643-1652. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30508-3.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316:1039-43. doi:

10.1126/science.1141478

Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 2008;68:9479-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1643.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Sakatani T, Maemura K, Hiyama N, Amano Y, Watanabe K, Kage H, Fukayama M, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Takai D. High expression of IRE1 in lung adenocarcinoma is associated with a lower rate of recurrence. *Jpn J Clin Oncol.* 2017 Mar17;1-8. doi: 10.1093/jjco/hyx031. [Epub ahead of print] 査読有

Ishikawa R, Amano Y, Kawakami M, Sunohara M, Watanabe K, Kage H, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D. The chimeric transcript RUNX1-GLRX5: a biomarker for good postoperative prognosis in Stage IA non-small-cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46:185-9. doi: 10.1093/jjco/hyv187. 査読有

Watanabe K, Amano Y, Ishikawa R, Sunohara M, Kage H, Ichinose J, Sano A, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Histone methylation-mediated silencing of miR-139 enhances invasion of non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2015;4:1573-82. doi: 10.1002/cam4.505. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

Sakatani T, Maemura K, Hiyama N, Amano Y, Watanabe K, Kage H, Fukayama M, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Takai D. High expression of endoplasmic reticulum oxidoreductin (ERO) 1L is associated with resistance to cisplatin. 4th AACR-IASLC international joint conference, San Diego (U.S.A.), 2016.01.04-07

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

天野 陽介 (AMANO, Yosuke)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50749330

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )